

【総説】

粘膜免疫誘導における Microfold (M) 細胞を介した抗原の認識

長澤 裕哉 林 智人*

(国研)農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門病態研究領域 寒地酪農衛生ユニット
 〒062-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘4番地

呼吸器、消化器、生殖器あるいは泌乳器など、外部との境界となる粘膜面を持つ器官には、全身免疫系とは一線を画した粘膜免疫系が存在し、個々の器官の粘膜局所における粘膜免疫系が微生物感染の免疫応答に必須であることが明らかにされている。粘膜免疫系のユニークな特性には、粘膜感染症の感染の場である粘膜面において、微生物に対する特異的なIgA抗体を分泌できることや、抗原が感作された部位と異なる別の粘膜面においても感染防除の効果を示す免疫応答が誘導できることなどがある。ヒトの医療分野では、粘膜免疫系の免疫誘導機序を活用した粘膜ワクチンを用いて、ウイルスや細菌の感染症予防の取組が既に始まっている。

一方、外界と接している粘膜面には上皮幹細胞から分化した特殊なMicrofold (M) 細胞が存在している。M細胞は粘膜面の下部に位置する粘膜免疫系リンパ組織に外来性抗原や病原微生物を送り込む入口として重要な役割を持っている。また、近年M細胞の管腔側の細胞表面に病原微生物に対する受容体があることがヒトやマウスの研究から明らかにされ、M細胞は感染を制御する粘膜免疫系の起点となっている可能性がある。したがって粘膜ワクチンを開発する上では、M細胞の構造と機能を理解しておく必要がある。

粘膜面で微生物感染を伴う疾患は、牛、豚あるいは鶏の家畜・家畜においても存在し、そのいずれの疾患発症においても畜産物の生産性の減少ひいては農家の経営に大きく影響する。将来的には家畜の飼養管理においても粘膜ワクチンが使用される可能性がある。著者らは家畜での粘膜ワクチンの開発には家畜ごとの粘膜免疫に関する基礎研究が必要になるとともに、粘膜面からの外来性抗原や病原微生物の入口として機能するM細胞の研

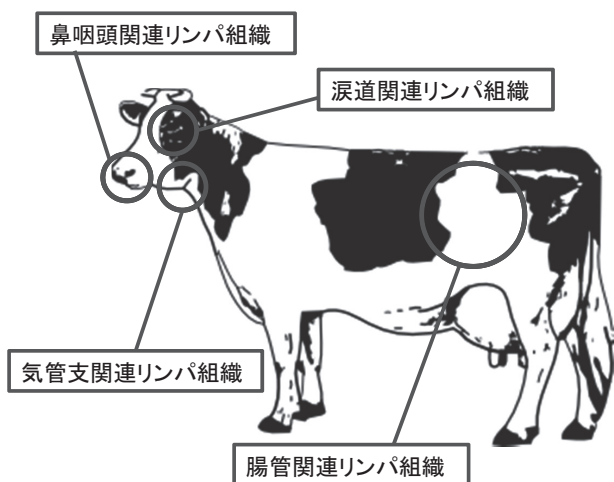
究を進める必要があると考えている。本稿では、ヒトやマウスの研究でこれまでに得られている粘膜免疫系の誘導機序とそれに関係するM細胞の形態および機能の知見、ならびに著者らが行った牛を用いた研究から得られた知見も交えて解説したい。

粘膜免疫系の役割と存在意義

呼吸器、消化器あるいは生殖器などの粘膜面は、摂取された食物や空気中の様々な物質（免疫学的には抗原）を認識し、それらに毒性があった場合は物理的および化学的に清浄化する機能をもっている。さらに外来性抗原が出入りする頻度が高い粘膜面においては、その粘膜器官に適応した粘膜免疫系を備え、物理的、化学的な清浄化機序とは別の免疫学的な機序、すなわち粘膜免疫系を働かせて生体を保護している。一般に健康な成人は、粘膜免疫系に関与する粘膜関連リンパ組織 (Mucosa Associated Lymphoid Tissue: MALT) 中に約80%の免疫細胞が存在しているといわれ、免疫を司る細胞の量からも生体の保護における粘膜免疫系の重要性がうかがえる^[1]。

基本的に粘膜免疫系には、(1)体外から侵入してきた物質や微生物および体内に潜在的に常在している微生物（常在細菌叢も含む）を監視する、(2)体外からの侵入した物質に対し積極的な免疫応答をとるか消極的な免疫応答（免疫寛容）をとるかを見極める、(3)積極的な免疫応答を必要とする有害物質や病原微生物が生体内部に侵入した場合それらを排除する、などの役割がある。現在までのところ、ヒトやマウスに比べて、粘膜で外来性物質を監視する役割を持つMALTの存在部位に関する牛の知見は少ないが、図1に牛でMALTの存在が予想され

*連絡責任者：林 智人 (国研)農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門病態研究領域 寒地酪農衛生ユニット
 〒062-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘4番地
 TEL: 011-851-5226 (代)-5226 FAX: 011-853-0767 E-mail: hayatomo@affrc.go.jp



※ここではヒトで明らかにされた組織として示す
 図1. 牛でも存在が予想されるMALTの位置

る位置を示した。

粘膜免疫系による抗原に対する免疫応答

粘膜感染では、粘膜器官に固有のMALTがその免疫応答の中心的な役割を担う。MALTは、感染局所の免疫反応を誘導させるために特化した構造を持ち、基本的には全身免疫系と一線を画している。解剖学的なMALTの構造の特徴としては、(1)抗原提示細胞 (Antigen Presenting Cell : APC)、T細胞あるいはB細胞などの役割が異なるそれぞれの細胞集団が特定の区画に配置されていること、(2)未成熟リンパ球および抗原提示能をもつ樹状細胞 (Dendritic Cell : DC) の小さなクラスターが粘膜上皮細胞の周辺に存在して、抗原提示を受けたリンパ球を抗体が抗原に結合した後の反応を惹起するエフェクター機能をもつ細胞に効率よく成熟させることのできる領域を独立して持つこと、などがあげられる[2,3]。図2には腸管パイエル板の構造を例として示した。個々の粘

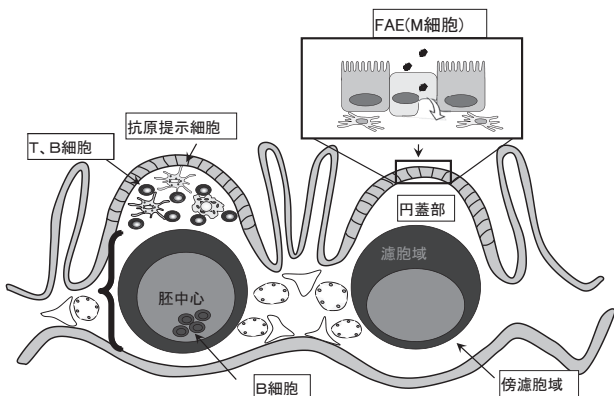


図2. 腸管関連リンパ組織 (パイエルパッチの例)

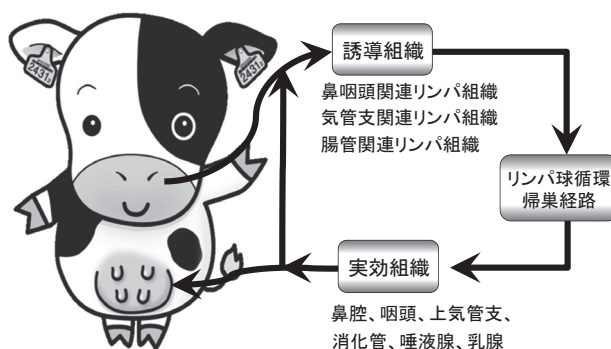


図3. 共通粘膜免疫システム (CMIS) とリンパ球循環帰巢経路

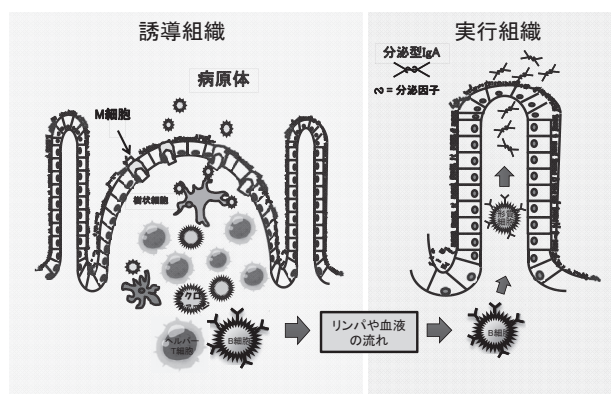


図4. 粘膜免疫系における誘導組織と実行組織

膜においてMALTとして存在しているのは、消化器では、腸管パイエル板、腸間膜リンパ節、腸内濾胞および孤立性小胞など、呼吸器では、鼻咽頭関連リンパ組織 (Nasal Associated Lymphoid Tissue : NALT) および外来性の異物の生体への入口に位置しているアデノイドを含むワルダイエル扁桃輪などである。特異的抗体の産生やウイルスに感染した細胞を攻撃できるように、特定のMALTで方向付けされたリンパ球が別のMALTに付随する粘膜部位に移動(ホーミング)できるような共通粘膜免疫システム (Common Mucosal Immune System : CMIS) の機序があることも知られている (図3) [4,5]。一般に抗原を認識したMALTを誘導組織と呼び、特異的免疫応答が発揮できるようにMALTで分化したリンパ球がCMISによって移動した先の粘膜組織を実行組織と呼ぶ (図4)。

誘導組織の粘膜面の下部には、MALTに抗原を送込むことに特化したM細胞がある。外部との境界の粘膜面を通過する外来性の抗原 (食餌性タンパクや微生物) の一部は、M細胞に取込まれ細胞の内部あるいは下部に存在しているDCやAPCに貪食され、その後未成熟なB細胞やCD4⁺ヘルパーT細胞あるいはCD8⁺キラーT細胞に抗原提示される[6]。外来性の特殊な抗原では粘

膜面に存在する多様性の限られた $\gamma\delta$ 型T細胞やNKT細胞に直接認識されることもあるが、基本的にはMALT内のDCやAPCによってB細胞へ抗原提示されて、抗原特異的抗体産生や抗原特異的細胞傷害などのエフェクター機能を持つ免疫細胞に分化する。M細胞の構造や機能に関しては以後の節において詳しく説明する。

誘導組織でエフェクター機能をもつ細胞に方向づけられたB細胞やT細胞は、抗原と最初の遭遇した部位（例えば、腸管におけるパイエル板）を離れ、CMISを通して別の粘膜部位にホーミングして、抗体産生能をもつ形質細胞（B細胞が分化した細胞）や細胞傷害T細胞となる[7,8]。エフェクター機能を持つB細胞やT細胞の細胞膜上では、様々な感染局所の細胞から分泌された細胞遊走に関わる因子（ケモカイン）を感知するインテグリンやアドレシンの受容体からの情報を介して目的の粘膜組織にホーミングする[7,8]。例えば、腸管膜リンパ節やパイエル板から単離されたマウスのDCは、腸管粘膜へのホーミング受容体 $\alpha 4\beta 7$ [9,10]およびCCR9[10]の発現を増加させ、それらと相互作用する腸管関連のケモカインTECK/CCL25が発現している記憶T細胞を目的の実効組織へ移動させる作用をもつ。さらに興味深いことには、腸管へホーミングするT細胞やB細胞の移動先を運命づける腸管DCには、レチノイン酸を特異的に分泌する機能があるが、腸管以外のリンパ器官由来のDCはレチノイン酸が分泌されないことが知られている[11]。このように特定のMALTで方向付けされた免疫細胞が、そのMALTが付随する粘膜部位だけではなく、別の粘膜部位でも効率よく特異的な免疫応答を発揮することのできるCMISの存在は、粘膜面での感染制御における粘膜免疫系の重要性を示しているものと思われる。

粘膜感染を防御する免疫応答と免疫寛容

目的の実行組織にCMISを介して移動したB細胞（形質細胞）などは、粘膜面に抗原特異的な分泌型IgA（Secretory IgA：SIgA）抗体を粘膜面に分泌する。分泌されたSIgAは、細菌やウイルスなどの微生物が粘膜上皮へ接着するのを阻止して、体内への侵入を阻害すること、また病原菌が分泌する毒素等と結合することで毒素の体外への排出を促進するなどの機能により、粘膜面での感染を制御している。興味深いことに、粘膜面に接着した病原体および毒素タンパク質抗原に対する特異的SIgAを産生する形質細胞の誘導は、ヘルパーT細胞に依存し[12,13]、一方、共生細菌叢に対してSIgAを産生する抗原特異的な形質細胞は、胸腺非依存性[14]の低親和性

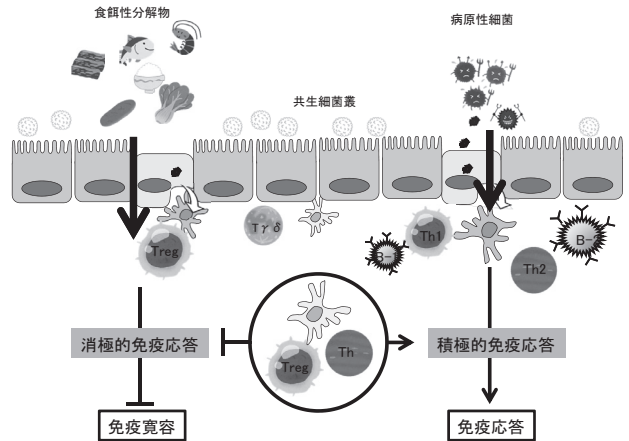


図5. 粘膜面における積極的免疫応答と免疫寛容

のT細胞に依存していることが報告されている[15]。また、ヒトでは、IL-4、IL-10およびTGF- β などのサイトカインがIgA産生細胞への分化やSIgAへのクラススイッチを制御していること[16,17]、MALTにおける抗原の認識とT細胞やB細胞のエフェクター機能への分化の誘導が抗原の性質やAPCのタイプおよびそれらが出会う際の局所の微小環境によって支配されること、などが明らかにされている。粘膜面に存在するほとんどの抗原は非病原性の物質（例えば食餌に含まれるタンパク質など）であり、それらの物質に対しては、粘膜のAPCやDCが関与する積極的な免疫応答が起こらないよう2型ヘルパーT細胞（Th2）の作用、あるいは免疫を制御する調節するT細胞（Treg）により寛容になることが知られている[18]（図5）。したがって、各粘膜に付随するMALTは、外来性の物質に対して積極的な免疫（免疫応答）をとるかあるいは消極的な免疫（免疫寛容）をとるかを制御する機能も持つ。

粘膜免疫の誘導起点となるM細胞の重要性

MALTにおける粘膜免疫を誘導する起点として働くM細胞の役割に関しては、既によく知られている腸管関連リンパ組織（Gut-Associated Lymphoid tissue：GALT）のパイエル板を例にして説明する（図2）。腸管パイエル板には、リンパ組織の表面を一層で覆う濾胞関連上皮（Follicle-Associated Epithelium：FAE）が存在している[19]。FAEには、粘膜面と接触する外来性の異物を物理的に排除するための粘膜液を分泌する杯細胞や腸管内分泌細胞などの細胞がほとんどなく、外来性抗原が容易にFAEに接触することから、FAE自体のバリア機能は脆弱であるといわれている[20,21]。M細胞は、それらの外来性の異物を細胞内に取込んで、下部リンパ

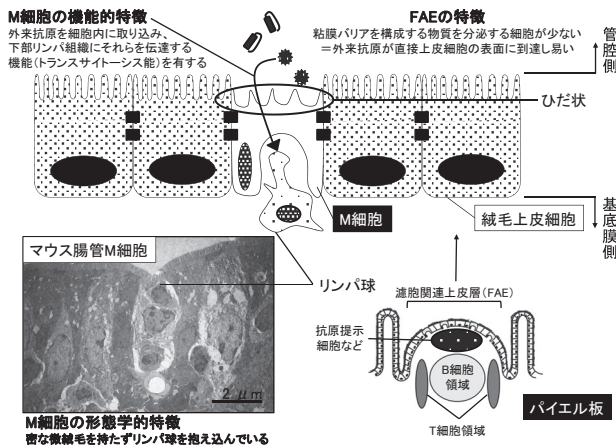


図6. 外来抗原を取り込むM細胞の形態および機能的特徴

組織にそれらを移送するいわゆるトランスサイトシスの機能を持つ。M細胞は下部のリンパ組織に抗原を送り込むことによって、有害な食餌性タンパク質や病原微生物あるいはウイルスなどを排除する粘膜免疫系を効率よく誘導させている(図6)^[22]。M細胞を介してMALT内に移動した外来性の異物は、上皮層の下部に存在する樹状細胞などの抗原提示細胞に貪食され、その細胞内のリソソームで抗原を分解する過程を経て未成熟なB細胞へ抗原の情報を提示し(図4)、抗原特異的SIgA抗体を産生する形質細胞に分化・成熟させる。形質細胞から分泌されたSIgAは、分泌因子(Secretory Component)を付加させ、実効組織の上皮細胞の基底膜側で分泌因子を認識するポリIgレセプターと結合して外界との境界の管腔側の粘膜層に多量に放出される。そのSIgAがその場にきた病原性の細菌やウイルス、あるいは病原菌が分泌する毒素と結合することで粘膜感染を強力に防御している。SIgAと結合した有害物質や病原微生物はそのまま腸管を通り排出される(図4)^[23]。したがって抗原特異的SIgA抗体を誘導する免疫応答は、M細胞が外来抗原の取り込み口となり、感作起点となる。こうしたM細胞が存在するMALTは、GALTの他にヒトやマウスではNALT、気管支関連リンパ組織ならびに扁桃などの誘導組織で確認されている。またM細胞は、牛の難治性疾患における病原因子の入口として機能していることも、牛海面状脳症(Bovine Spongiform Encephalopathy: BSE)の研究で報告されている。BSEは生体内に取込まれた異常型プリオン蛋白が脳内で密集した β シート構造を持つアミロイドを形成して神経異常を引き起こす疾患であり^[24]、その物質の生体内における局在の研究により、BSEの病原因子である異常型プリオン

タンパクが、腸管のM細胞から取込まれて体内を移動することが報告された。その結果、M細胞が異常型プリオン蛋白によるBSEの病態発症の引き金になっていることが明らかとなった^[25-27]。実際BSE感染牛では、異常型プリオン蛋白が脳、脊髄、脊髄背側神経節、眼球といった中枢神経組織や、末端の神経系以外にも扁桃や回腸パイエル板といったMALTでも検出されることが報告されている^[28]。

M細胞の形態と機能

M細胞を基底膜側からみると、細胞内に陥没している様なポケット構造が形成されており、そこにはリンパ球および樹状細胞が高頻度で存在している。こうした構造があることによって、M細胞は管腔側から基底膜側へ効率良く外来性の抗原を移送できる(図6)^[22]。その他M細胞の特徴としては、管腔側の細胞表面において、消化器官の吸収上皮で見られるような微絨毛が密に存在する構造がなく、管腔側の細胞表面の膜がひだ状になっている特徴的な構造を形成していることが解剖学的に明らかにされている(図6)^[22]。このことから、M細胞は外来抗原を下部の抗原提示細胞に効率良く移送しやすくするため、管腔側をひだ状に進化させたとも考えられている^[29]。M細胞内の管腔側から基底膜側への抗原移送の機能に関しては、タンパク抗原あるいは細菌と同じ大きさのラテックスビーズがほぼ同じ効率で細胞内を移送されることが明らかにされていることから、M細胞内における物資の移動は非特異的な移送ともいわれている。以前の研究から、生のコレラ菌ではM細胞を介して積極的な取込みが起こる。そのコレラ菌を死菌処理をすると取込み効率が有意に低くなること、あるいは大腸菌でも株の違いによって取込まれる効率に違いがあることが明らかにされており、M細胞による取り込みには何らかの特異的な機序が存在していることも示唆されている^[20]。M細胞の特異的のマーカとして使用されるGlycoprotein-2が、免疫応答の増強と関連しているといわれている大腸菌やサルモネラ菌が持つ線毛蛋白質であるFimHに依存して結合することから、M細胞はFimHをもつ細菌を選択的に取込んでいることも最近明らかにされている^[30]。さらに著者らは、M細胞に分化させた牛腸管上皮細胞株を抗-Aldolase A抗体処理を行うことで、プリオン蛋白を結合させたラテックスビーズのみが細胞内移送を抑制されることを明らかにし、M細胞内を移動する物資はAldolase Aの有無によって特異性を持たせていることを明らかとした^[31]。また、正常型プ

リオンタンパクの本来の機能的な役割は未だ知られていないが、興味深いことに、これらのGlycoprotein-2やAldolase Aと同じように、プリオンタンパクがM細胞における抗原の細胞内移動に強く関与することが示唆されている^[32]。今後、さらにM細胞機能の詳細が解明され、それぞれの分子のもつ役割が明らかにされれば、M細胞が取込む抗原に選択性を持たせた細胞内移送を人為的に制御できる可能性がある。したがってM細胞をワクチン抗原の感作起点として利用した粘膜ワクチンの開発への取組もより一層必要になると考えられる。

ワクチン抗原をM細胞に特異的に送達させる方法

粘膜では前述したように物理的、化学的バリア機能が発達しているため、外来性の抗原の生体内への導入は簡単ではない。特にワクチンを消化器系の器官から感作させる場合には、抗原が腸管のMALTに送達される前に分解されてしまう可能性がある。結果として経口投与では、粘膜免疫系の抗原特異的な免疫応答を誘導することも難しい。特に牛は反芻胃の消化器をもつことから、他の哺乳動物と比べて消化酵素の影響を強く受け易いため、経口投与によりワクチン効果を出すことは困難であると考えられている。この問題を克服するためには、粘膜面に存在するM細胞に抗原を効率的に送達させる技術の開発が必要となる。これまでに粘膜免疫を誘導するアジュバントとして、コレラ毒素や大腸菌易熱性毒素が使用され、それらに一定のアジュバント効果があることが示されている。しかし細菌毒素由来のアジュバントの使用は、宿主の神経麻痺や腸重積症などの副作用が出る可能性があることから、産業動物に対して安全性を疑われるアジュバントを利用することは現状では困難である^[33-35]。最近ではそれらにかわり効率的かつ安全に抗原を伝達する技術として、サイトカインによる免疫を活性化する方法や、ナノゲルでワクチン抗原を処理することで上皮細胞との接触を高めるといった方法が開発されている^[33,36,37]。さらに前述したように、M細胞をターゲットにしたワクチン抗原の指向性を高めることができれば、さらに効果的なワクチンが開発できる可能性もある(図7)。近年、M細胞が持つUEA-1分子を抗原にして特異的なモノクローナル抗体NKM16-2-4を作製し、この抗体をワクチン抗原と結合させることにより、マウスにおいてワクチン抗原を効率よくM細胞に送達させられたことが報告された^[38]。この報告では、本来ボツリヌストキソイドを経口投与することで致死するマウスが、

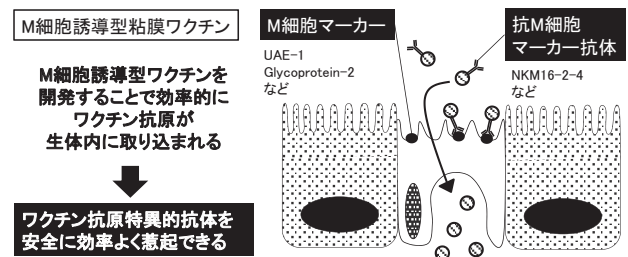


図7. M細胞をターゲットとするデリバリー技術を用いた粘膜ワクチン

このNKM16-2-4抗体にボツリヌストキソイドを結合させた抗原を投与することで、死を回避することが可能であった^[38]。UEA-1分子の他にも、Glycoprotein-2などがM細胞に特異的な分子であることが知られていることから、これらをM細胞に指向性を持たす抗体として応用することで、M細胞を標的とした粘膜免疫誘導型ワクチンの効率が高められる可能性がある。また、M細胞の分化誘導因子であるReceptor Activator of NF- κ B Ligandが^[39]、マウスのNALTにおいても発現されることが報告されたことから^[40]、GALTと同様に鼻腔の鼻腔関連リンパ組織のM細胞への分化誘導も可能となると考えられる。牛においては、腸管パイエル板におけるM細胞マーカーとしてCytokeratin 18、Aldolase AおよびCyclophilin Aなどの分子も報告されており、これらを用いてM細胞を標的とした粘膜ワクチンの開発ができる可能性も期待される^[31,41,42]。

感染症に対する粘膜ワクチンと展望

粘膜ワクチンに対する研究は、全身免疫応答を誘導する注射型ワクチンに比べてまだ少ないが、近年徐々に基礎的な知見が蓄積されつつある。またCMISの利用で病原性微生物が粘膜上皮への付着・増殖や、ウイルスや細菌の感染を防止するエフェクター作用を、抗原感作が誘導された組織から別の実行組織にホーミングさせることができることから、CMISの概念に立脚した粘膜ワクチンの開発が最近注目されている。ヒトでは難治性の粘膜感染症に対して粘膜ワクチンの開発が進んでいる。例えば、ヘリコバクターピロリ、コレラ菌、腸毒素原性大腸菌、赤痢菌、ディフィシル菌、ロタウイルスおよびカリシウイルスによって引き起こされる胃腸感染、インフルエンザウイルスおよび呼吸器合胞体ウイルスによって引き起こされる呼吸器感染、クラミジアおよび単純ヘルペスウイルスによる生殖器感染症などが、粘膜ワクチンの対象となっている。

一方、獣医領域の動物における粘膜免疫の基礎的知見は少ない。近年著者らは、黄色ブドウ球菌性乳房炎罹患牛の乳汁中排菌数と上皮細胞の割合とに正の相関があることを示し^[43]、粘膜感染症の防除における上皮細胞保護の重要性を示唆した。しかし牛の粘膜面での抗原特異的なT細胞やB細胞の機能を評価するためのアッセイ技術は依然として不十分であり、粘膜ワクチンの効果を予測する方法論はまだない。その状況の中で平成27年度に、牛の牛伝染性鼻気管炎ウイルスと牛パラインフルエンザ3型の2種のウイルスに対する牛の呼吸器病用の粘膜生ワクチンが国内で承認された。現在著者らは、黄色ブドウ球菌性乳房炎を念頭に、黄色ブドウ球菌が感染初期に乳腺組織の粘膜面での定着・増殖に関与する細胞表面層蛋白や毒素分泌を制御する蛋白などをターゲットにしたワクチンの候補抗原を探索し、それらの働きを特異的に阻止するSIgA抗体を乳腺粘膜上に分泌させる粘膜免疫誘導型のワクチン開発を進めている。近い将来、家畜の生産現場で活用できる粘膜ワクチンの実用化を目指したい。

おわりに

M細胞は粘膜免疫における抗体産生を惹起させる入口として機能するユニークな細胞であり、粘膜ワクチンの開発においてもワクチン抗原の感作起点になる細胞として注目されている。M細胞の研究は、M細胞特異的マーカーや分化誘導因子の発見といった基礎的な知見が近年集まりつつあり、粘膜感染症のメカニズム研究や粘膜ワクチン開発への応用が進んでいる。そのため、今後の家畜感染症を予防するワクチンを考える上では、粘膜免疫系における抗原に対する高親和性のSIgA抗体産生を惹起させる技術と、粘膜免疫の入口としての重要性があるM細胞の研究を更に進める必要があると考えている。

引用文献

[1] Pabst R: Overview of the mucosal immune system structure, *Principles of Mucosal Immunology*, Smith PD, *et al* eds, 1-18, Garland Science, New York, (2012)

[2] Ishikawa H, Saito H, Suzuki K, Oida T, Kanamori Y: New gut associated lymphoid tissue "cryptopatches" breed murine intestinal intraepithelial T cell precursors, *Immunol Res*, 20, 243-250 (1999)

[3] Guy-Grand D, Azogui O, Celli S, Darche S,

Nussenzweig MC, Kourilsky P, Vassalli P: Extrathymic T cell lymphopoiesis; ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice, *J Exp Med*, 197, 333-341 (2003)

[4] Mowat AM: Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens, *Nat Rev Immunol*, 3, 331-341 (2003)

[5] Kiyono H, Fukuyama S: NALT-versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity, *Nat Rev Immunol*, 4, 699-710 (2004)

[6] Iwasaki A, Kelsall BL: Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells, *J Exp Med*, 190, 229-239 (1999)

[7] Campbell DJ, Debes GF, Johnston B, Wilson E, Butcher EC: Targeting T cell responses by selective chemokine receptor expression, *Semin Immunol*, 15, 277-286 (2003)

[8] Kunkel EJ, Butcher EC: Plasma-cell homing, *Nat Rev Immunol*, 3, 822-829 (2003)

[9] Stagg AJ, Kamm MA, Knight SC: Intestinal dendritic cells increase T cell expression of alpha4beta7 integrin, *Eur J Immunol*, 32, 1445-1454 (2002)

[10] Mora JR, Bono MR, Manjunath N, Weninger W, Cavanagh LL, Roseblatt M, Von Andrian UH: Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells, *Nature*, 424, 88-93 (2003)

[11] Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song SY: Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells, *Immunity*, 21, 527-538 (2004)

[12] Lycke N, Eriksen L, Holmgren J: Protection against cholera toxin after oral immunization is thymus-dependent and associated with intestinal production of neutralizing IgA antitoxin, *Scand J Immunol*, 25, 413-419 (1987)

[13] Hornquist CE, Ekman L, Grdic KD, Schon K, Lycke NY: Paradoxical IgA immunity in CD4-deficient mice. Lack of cholera toxin-specific protective immunity despite normal gut mucosal IgA differentiation, *J Immunol*, 155, 2877-2887 (1995)

[14] Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM: A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria, *Science*, 288,

- 2222-2226 (2000)
- [15] Stoel M, Jiang HQ, van Diemen CC, Bun JC, Dammers PM, Thurnheer MC, Kroese FG, Cebra JJ, Bos NA: Restricted IgA repertoire in both B-1 and B-2 cell-derived gut plasmablasts, *J Immunol*, 174, 1046-1054 (2005)
- [16] Goodrich ME, McGee DW: Regulation of mucosal B cell immunoglobulin secretion by intestinal epithelial cell-derived cytokines, *Cytokine*, 10, 948-955 (1998)
- [17] Asano T, Kaneko H, Terada T, Kasahara Y, Fukao T, Kasahara K, Kondo N: Molecular analysis of B cell differentiation in selective or partial IgA deficiency, *Clin Exp Immunol*, 136, 284-290 (2004)
- [18] Billsborough J, Viney JL: Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance and disease, *Gastroenterology*, 127, 300-309 (2004)
- [19] Hase K, Ohno H: Epithelial cells as sentinels in mucosal immune barrier, *Nihon Rinsho Meneki Gakkaikai Kaishi*, 29, 16-26 (2006)
- [20] Owen RL: Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches—a personal and historical perspective, *Semin Immunol*, 11, 157-163 (1999)
- [21] Kraehenbuhl JPP, Neutra MR: Epithelial M cells; differentiation and function, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, 301-332 (2000)
- [22] Beier R, Gebert A: Kinetics of particle uptake in the domes of Peyer's patches, *Am J Physiol*, 275, 130-137 (1998)
- [23] Lycke NY, Bemark M: The role of Peyer's patches in synchronizing gut iga responses, *Front Immunol*, 3, 1-9 (2012)
- [24] Mabbott NA, Bruce ME: The immunobiology of TSE diseases, *J Gen Virol*, 82, 2307-2318 (2001)
- [25] Takakura I, Miyazawa K, Kanaya T, Itani W, Watanabe K, Ohwada S, Watanabe H, Hondo T, Rose MT, Mori T, Sakaguchi S, Nishida N, Katamine S, Yamaguchi T, Aso H: Orally administered prion protein is incorporated by m cells and spreads into lymphoid tissues with macrophages in prion protein knockout mice, *Am J Pathol*, 179, 1301-1309 (2011)
- [26] Donaldson DS, Kobayashi A, Ohno H, Yagita H, Williams IR, Mabbott, NA: M cell-depletion blocks oral prion disease pathogenesis, *Mucosal Immunol*, 5, 216-225 (2012)
- [27] Lawson VA, Furness JB, Klemm HM, Pontell L, Chan E, Hill AF, Chiocchetti R: The brain to gut pathway; a possible route of prion transmission, *Gut*, 59, 1643-1651 (2010)
- [28] Hoffmann C, Ziegler U, Buschmann A, Weber A, Kupfer L, Oelschlegel A, Hammerschmidt B, Groschup MH: Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy, *J Gen Virol*, 88, 1048-1055 (2007)
- [29] 長谷耕二、大野博司: 特殊な腸管上皮細胞、M細胞の生物学、生化学、83、13-22 (2006)
- [30] Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, Kadokura K, Tobe T, Fujimura Y, Kawano S, Yabashi A, Waguri S, Nakato G, Kimura S, Murakami T, Iimura M, Hamura K, Fukuoka S-I, Lowe AW, Itoh K, Kiyono H, Ohno H: Uptake through glycoprotein 2 of FimH+ bacteria by M cells initiates mucosal immune response, *Nature*, 462, 226-230 (2009)
- [31] Nagasawa Y, Takahashi Y, Itani W, Watanabe H, Hidaka Y, Imamura M, Yokoyama T, Horiuchi M, Sakaguchi S, Mohri S, Michael TR, Nochi T, Aso H: Prion protein binds to Aldolase A produced by bovine intestinal M cells, *Open J Vet Med*, 5, 43-60 (2015)
- [32] Nakato G, Hase K, Suzuki M, Kimura M, Ato M, Hanazato M, Tobiume M, Horiuchi M, Atarashi R, Nishida N, Watarai M, Imaoka K, Ohno H: Cutting edge; *Brucella abortus* exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor, *J Immunol*, 189, 1540-4 (2012)
- [33] Holmgren J, Czerkinsky C, Eriksson K, Mharandi A: Mucosal immunisation and adjuvants; A brief overview of recent advances and challenges, *Vaccine*, 21, 89-95 (2003)
- [34] Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, Spyr C, Steffen R: Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland, *N Eng J Med*, 350, 896-903 (2004)
- [35] Program NI, Murphy TV, Gargiullo PM, Mas-

- soudi MS, Nelson DB, Jumaan AO, Okoro CA, Zanardi LR, Setia S, Fair E, LeBaron CW, Wharton M, Livengood JR, Livingood JR: Correction: Intussusception among infants given an oral Rotavirus vaccine, *N Eng J Med*, 344, 1564 (2001)
- [36] Nochi T, Yuki Y, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, Kohda T, Harada N, Kong IG, Sato A, Kataoka N, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Tsukada H, Kozaki S, Akiyoshi K, Kiyono H: Nano-gel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines, *Nat Mater*, 9, 572-578 (2010)
- [37] Rhee JH, Lee SE, Kim SY: Mucosal vaccine adjuvants update, *Clin Exp Vaccine Res*, 1, 50-63 (2012)
- [38] Nochi T, Yuki Y, Matsumura A, Mejima M, Terahara K, Kim DY, Fukuyama S, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y, Kohda T, Kozaki S, Igarashi O, Kiyono H: A novel M cell specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific immune responses, *J Exp Med*, 204, 2789-2796 (2007)
- [39] Knoop KA, Kumar N, Butler BR, Sakthivel SK, Taylor RT, Nochi T, Akiba H, Yagita H, Kiyono H, Williams IR: RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium, *J Immunol*, 183, 5738-5747 (2009)
- [40] Mutoh M, Kimura S, Takahashi-Iwanaga H, Hisamoto M, Iwanaga T, Iida J: RANKL regulates differentiation of microfold cells in mouse nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT), *Cell Tissue Res*, 364, 175-84 (2015)
- [41] Hondo T, Kanaya T, Takakura I, Watanabe H, Takahashi Y, Nagasawa Y, Terada S, Ohwada S, Watanabe K, Kitazawa H, Rose MT, Yamaguchi T, Aso H: Cytokeratin 18 is a specific marker of bovine intestinal M cell, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 300, 442-53 (2011)
- [42] Hondo T, Someya S, Nagasawa Y, Terada S, Watanabe H, Chen X, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Rose MT, Nochi T, Aso H: Cyclophilin A is a new M cell marker of bovine intestinal epithelium, *Cell Tissue Res*, 364, 585-97 (2016)
- [43] Nagasawa Y, Kiku Y, Sugawara K, Tanabe F, Hayashi T. Exfoliation rate of mammary epithelial cells in milk on bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus* is associated with bacterial load, *Anim Sci J*, In press (2017)